

Ethambutol の非定型抗酸菌に対する抗菌作用について

合 田 忠・阪 本 龍 夫

広島大学医学部細菌学教室 (主任 占部 薫 教授)

国立賀茂療養所 (所長 室津健司 博士)

受付 昭和 40 年 2 月 27 日

THE IN VITRO EFFECT OF ETHAMBUTOL ON
ATYPICAL MYCOBACTERIA*

Kiyosi GŌDA and Tatuō SAKAMOTO

(Received for Publication February 17, 1950)

A number of studies on the in vitro activity of ethambutol (EMB) against *M. tuberculosis* have been reported, while only a few reports concerning atypical acid-fast bacilli are noted. In this paper, the authors present their studies on the susceptibility in vitro of twenty-three strains of atypical mycobacteria and ten strains of acid-fast bacilli isolated from natural sources to EMB and to commonly used antituberculosis drugs, using 1% Ogawa egg medium and modified kirchner's agar medium (KYOKUTŌ product).

Nine out of ten strains of atypical mycobacteria pathogenic for man were inhibited completely in the concentrations of one to ten mcg per ml. of EMB. However, only five out of thirteen strains of casual isolates and five out of ten strains isolated from natural sources were inhibited in their macroscopic growth at the concentrations of five to ten mcg per ml. and one to ten mcg per ml. of EMB, respectively.

The number of the strains inhibited their growth in the concentrations of less than ten mcg per ml. of eight kinds of anti-tuberculosis drugs including EMB was in the following order :

INH > EMB > SM=Kanamycin(KM) > PAS > Cycloserine(CS) > Ethionamide(TH)=Tibione (TBI) in atypical mycobacteria pathogenic for man, KM > EMB > SM > INH > PAS=TH > CS > TBI in casual isolates, and EMB > SM=KM > INH among the acid-fast bacilli isolated from natural sources. None of the strains isolated from natural sources were inhibited their growth in the concentrations of less than ten mcg per ml. of PAS, CS, TH or TBI.

Thus, the inhibitory effect of EMB on atypical mycobacteria was much stronger than those of PAS, CS, TH, and TBI, and comparable to those of INH, SM and KM.

The slowly growing strains were more susceptible to anti-tuberculosis drugs, generally, than did the rapidly growing ones.

* From Hiroshima University, School of Medicine, Kasumi-cho, Hiroshima, Hiroshima Prefecture, Japan.

緒 言

2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol [Ethambutol]
は、1961 年 Lederle Laboratories Division の Wilkin-

son ら¹⁾によつて合成され、その D 体は in vitro なら
びに in vivo とともに、強力な抗結核作用を有すること
が明らかにされ、その後 Thomas ら²⁾および Karlson^{3),4)}
をはじめとする、内外多数の追試者による実験結果^{5)~16)}

が報告されるにいたつた。しかしながら本剤の抗非定型抗酸菌作用に関しては、わずかに Karlson⁴⁾, 伊藤ら¹⁰⁾, 山本ら¹¹⁾の報告がみられるにすぎないようである。われわれは占部教授の提唱する狭義および広義の非定型抗酸菌、ならびに自然界系抗酸菌の Ethambutol (以下 EMB) に対する感受性を、他の抗結核剤に対するそれと比較検討したので以下報告する。

実験材料ならびに方法

供試菌：狭義非定型抗酸菌計 10 株 [M. kansasii 1 株, Scotochromogens (Group II) 4 株, Nonphotochromogens (Group III) 4 株, M. fortuitum 1 株], 広義非定型抗酸菌計 13 株 (pigmented strains 10 株,

nonpigmented strains 3 株), ならびに自然界系抗酸菌計 10 株 (pigmented strains 3 株, nonpigmented strains 7 株) のほかに対照として、各 1 株ずつの人型結核菌、牛型菌、鳥型菌および M. smegmatis をも供試した (表 1, 表 2, 表 3 参照)。

1) 使試培地：EMB (科研化学) はそれぞれ 1 ml 当り 0.1 r, 1 r, 5 r, 10 r, 50 r, 100 r, 500 r および 1,000 r に、また SM, PAS, INH, Cycloserine (CS), Ethionamide (TH) および Tibione (TBI) は各 0.1 r, 1 r, 10 r, 100 r および 1,000 r にそれぞれ含有するところの 1% 小川培地ならびに薬剤非含有対照培地各 1 本ずつのほか、Kanamycin (KM) を 0.1 r, 1 r, 10 r, 100 r および 1,000 r にそれぞれ含有するところの変法 Kir-

Table 1. The Minimal Inhibitory Concentrations (γ/ml) of Various Antimicrobial on Atypical Mycobacteria Pathogenic for Man

Classification	Strain	Drug (γ/ml)							
		EMB	SM	KM	PAS	INH	CS	TH	TBI
M. kansasii	PI	5	10	10	100	10	10	>1,000	>1,000
Scotochromogens	Ökubo	10	10	10	100	10	>1,000	100	100
	P 6	5	10	100	10	10	100	100	100
	Aratani	10	>1,000	1,000	10	10	100	100	100
	Kurata	1	100	100	100	10	10	100	1,000
Nonphotochromogens	P 25	10	1,000	100	>1,000	10	>1,000	10	>1,000
	Köfu	5	10	10	1,000	10	100	>1,000	1,000
	Okayama	5	10	10	1,000	10	100	100	>1,000
	Matubara	1	100	1	1	10	100	100	10
Rapid-grower	M. fortuitum	100	1,000	100	>1,000	10	1,000	1,000	>1,000

Note: EMB=Ethambutol, SM=Streptomycin, KM=Kanamycin, PAS=Para-aminosalicylic Acid, INH=Isoniazide, CS=Cycloserine, TH=Ethionamide, TBI=Tibione.

The same rule applies correspondingly to the following tables.

Table 2. The Minimal Inhibitory Concentrations (γ/ml) of Various Antimicrobial on Atypical Mycobacteria of Casual Isolates

Classification	Strain	Drug (γ/ml)							
		EMB	SM	KM	PAS	INH	CS	TH	TBI
Pigmented strains	Yamasaki	>1,000	>1,000	10	>1,000	1,000	>1,000	1,000	>1,000
	Nakasima	10	10	10	10	100	100	10	1,000
	Kataoka	500	1,000	100	>1,000	1,000	>1,000	>1,000	>1,000
	Murakami	5	10	10	>1,000	1	100	1,000	1,000
	Kodama	100	100	100	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
	Deki	>1,000	>1,000	10	>1,000	1,000	>1,000	>1,000	>1,000
	Miyata	5	100	10	1,000	10	100	1,000	1,000
	Sugimoto	10	>1,000	1	>1,000	1,000	>1,000	>1,000	>1,000
	Hasumi	1	10	1	10	10	1	10	1,000
	Dai	>1,000	>1,000	100	>1,000	1,000	>1,000	>1,000	>1,000
Nonpigmented strains	Fuzii	50	1,000	100	>1,000	1,000	>1,000	1,000	>1,000
	Togikawa	50	1,000	100	>1,000	100	>1,000	100	>1,000
	Makio	50	10	10	100	>1,000	100	1,000	>1,000

Table 3. The Minimal Inhibitory Concentrations (γ/ml) of Various Antimicrobial on Acid-fast Bacilli Isolated from Natural Sources

Classification	Strain	Drug (γ/ml)							
		EMB	SM	KM	PAS	INH	CS	TH	TBI
Pigmented strains	B 3	50	100	10	>1,000	100	1,000	1,000	1,000
	B 14	50	100	100	>1,000	1,000	>1,000	100	1,000
	M. phlei	1	10	10	>1,000	10	>1,000	100	>1,000
Nonpigmented strains	S 50 B	1	10	100	>1,000	100	1,000	1,000	>1,000
	B 6	10	1,000	100	>1,000	1,000	>1,000	1,000	1,000
	B 10	10	1,000	100	>1,000	1,000	>1,000	>1,000	>1,000
	B 15	50	1,000	1,000	>1,000	1,000	>1,000	100	1,000
	B 16	50	1,000	1,000	>1,000	10	>1,000	100	1,000
	B 5	100	1,000	1,000	>1,000	1,000	>1,000	100	1,000
	238	5	10	10	>1,000	100	>1,000	1,000	1,000
Control	H ₃₇ Rv	5	1	1	1	1	100	100	1,000
	USI 263	10	1	1	1	1	100	10	1,000
	A 3717	10	100	100	10	100	100	100	1,000
	M. smegmatis	5	100	10	>1,000	100	1,000	100	>1,000

Table 4. The Number of the Strains in the Minimal Inhibitory Concentrations of Less Than Ten γ per ml. of Various Antimicrobial

Classification	Number	Drug							
		EMB	SM	KM	PAS	INH	CS	TH	TBI
Atypical mycobacteria pathogenic for man	10	9	5	5	3	10	2	1	1
Atypical mycobacteria of casual isolates	13	5	4	8	2	3	1	2	0
Acid-fast bacilli isolated from natural sources	10	5	3	3	0	2	0	0	0

chner 寒天培地 (極東製薬の変法 Kirchner 粉末寒天を法のごとく溶解, 高圧滅菌後 50°C で 5% の割に牛血清を加えたもの), ならびに薬剤を含まない同種 (対照) 培地を各 1 本ずつ供試した。

2) 実験方法: 狭義非定型抗酸菌は 1% 小川培地上に 3 週間培養したものを, また広義非定型抗酸菌および自然界系抗酸菌では, 同じく 2 週間培養したものをそれぞれ法に従って 10⁻² mg/ml の均等浮遊液とし, それらの 0.1 ml ずつを上記の各培地に移植し, 37°C で培養し, いずれも 4 週後にその成績をよみとつた。

実験成績

EMB 他 7 種の抗結核剤の非定型抗酸菌に対する管内抗菌作用については, 一括して表 1 および表 2 に, また自然界系抗酸菌に対するそれは表 3 にそれぞれ示した。

すなわちまず狭義非定型抗酸菌の EMB に対する感受性は表 1 に示すように, 供試 10 株のうち 2 株 (Scotocromogen 倉田株, Nonphotochromogen 松原株) は 1 γ/ml で, 4 株 (M. kansasii P 1 株, Scotocromogen

P 6 株, Nonphotochromogen 甲府株, 同岡山株) は 5 γ/ml で, また 3 株 (Scotocromogen 大久保株, 同荒谷株, Nonphotochromogen P 25 株) は 10 γ/ml でそれぞれ発育が完全に阻止されたが, M. fortuitum のみは 100 γ/ml ではじめてその発育の完全阻止がみられた。

広義非定型抗酸菌では表 2 に示すように, EMB によつて供試 13 株のうち 1 株 (pigmented strain 蓮見株) が 1 γ/ml で, 2 株 (pigmented strain の村上株, 同宮田株) が 5 γ/ml で, 2 株 (pigmented strain の中島株および同杉本株) は 10 γ/ml で, 3 株 (nonpigmented strain の藤井, 研川および榎尾の 3 株) がともに 50 γ/ml で, 1 株 (pigmented strain 小玉株) が 100 γ/ml で, また 1 株 (pigmented strain 片岡株) が 500 γ/ml でそれぞれ発育を完全に阻止されたが, 残りの 3 株 (pigmented strain の山崎, 同出来および同台の 3 株) は 1,000 γ/ml でもなお発育を阻止されなかつた。

次に自然界系抗酸菌についてみるに, 表 3 に示すように EMB によつて供試 10 株のうち, 2 株 (S 50 B 株, M. phlei 株) は 1 γ/ml で, 1 株 (238 株) は 5 γ/ml

で、また2株(B6株, B10株)は10 γ /mlでそれぞれ発育が阻止されたが、他の4株(B3株, B14株, B15株およびB16株)は50 γ /mlで、また残余の1株(B5株)は100 γ /mlでいずれもはじめて発育が阻止された。

なお対照に用いた人型結核菌 H37RV 株では EMB の 5 γ /ml で、また牛型菌 263 株および鳥型菌 A3717 株ではいずれもその 10 γ /ml でともに発育が完全に阻止された。

次に EMB と他の供試計 7 種の抗結核剤との、狭義および広義非定型抗酸菌ならびに自然界系抗酸菌に対する抗菌力の強弱を比較するために、いまかりに ≤ 10 γ /ml の濃度で発育を完全に阻止された菌株数ないし頻度を、非定型抗酸菌と自然界系抗酸菌とに分けて求めてみたところ表 4 に示すようになった。

この表から分かるように、狭義非定型抗酸菌では供試 10 株中、EMB では 9 株、INH では全菌株、SM および KM ではともに 5 株ずつ PAS では 3 株、CS では 2 株 TH および TBI ではそれぞれ 1 株ずつであった。

これに対して広義非定型抗酸菌にあつては供試 13 株中、EMB では 5 株、KM では 8 株、SM では 4 株、INH では 3 株、PAS および TH ではともに 2 株ずつ、CS では 1 株であった。

さらに自然界系抗酸菌についてみるに供試 10 株中、EMB では 5 株、SM および KM ではともに 3 株ずつ、INH では 2 株であったが、PAS、TH、CS および TBI では皆無であった。

総括ならびに考案

Karlson⁴⁾ は EMB は *M. kansasii* の管内発育を 1 ~ 5 γ /ml で阻止し、その抗菌力は人型結核菌 H₃₇Rv 株に対すると同程度であつたが、Nonphotochromogen や Scotochromogen に対しては菌株によつて発育阻止濃度にかかなりの差があつた旨を述べている。

伊藤ら¹⁰⁾ は *M. kansasii* および Forbes 84 株は EMB の 10 γ /ml で発育が阻止されたが、Scotochromogen の石井株および同渡辺株は 10 γ /ml でも阻止されなかつたと述べている。

われわれは 1% 小川培地を用いて、EMB の抗菌作用についてまず狭義非定型抗酸菌計 10 株を供試して検討したところ、Rapid-grower に属する *M. fortuitum* の 1 株を除き、他の 9 菌株までもが EMB の 1 ~ 10 γ /ml で完全発育阻止をこうむることがみられたのに対して、広義非定型抗酸菌では 13 株中ようやく 5 株 (38.5%) のみが 5 ~ 10 γ /ml によつてその発育を完全に阻止され

たにすぎなかつた。また自然界系抗酸菌にあつても 10 株中 5 株のみが 1 ~ 10 γ /ml によつて完全発育阻止を受けた。

ところで EMB 他 7 種の抗結核剤の各 ≤ 10 γ /ml の最小発育阻止濃度を示した菌株の頻度は、狭義非定型抗酸菌では INH > EMB > SM = KM > PAS > CS > TH = TBI、広義非定型抗酸菌では KM > EMB > SM > INH > PAS = TH > CS > TBI、また自然界系抗酸菌では EMB > SM = KM > INH の順であつた。なお自然界系抗酸菌に対しては PAS、CS、TH および TBI はこの濃度ではその発育を完全に阻止することはできなかつた。

なお Runyon の非定型抗酸菌群別と EMB に対する感受性との間には——供試菌株数が少なく確言ははばかれるが——一定の関連性はみられないようであつたが、しいていえば一般に速育株のほうが遅育株に比して多少とも、この感受性が低いようであつた。

結 語

1) 非定型抗酸菌 23 株ならびに自然界系抗酸菌 10 株に対する EMB の管内抗菌作用は、PAS、TH、CS、TBI よりはるかに強力であり、また INH、SM および KM に勝るとも劣らないもののあることがみられた。

2) EMB に対する感受性菌株の頻度は狭義非定型抗酸菌 > 広義非定型抗酸菌 = 自然界系抗酸菌 の順であつた。

3) EMB に対する抗酸菌の感受性の程度は、一般的に遅育株のほうが速育株に比してより大であつた。

参 考 文 献

- 1) Wilkinson, et al.: J. Am. Chem. Soc., 83: 2212, 1961.
- 2) Thomas, et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 83: 891, 1961.
- 3) Karlson: Am. Rev. Resp. Dis., 84: 902, 1961.
- 4) Karlson: Am. Rev. Resp. Dis., 84: 905, 1961.
- 5) Lal, et al.: Am. Rev. Resp. Dis., 87: 870, 1963.
- 6) Kuck: Am. Rev. Resp. Dis., 87: 905, 1963.
- 7) Lucille, et al.: Vete. Ad. Arm. For., 351, 1962.
- 8) Schmidt, et al.: Vete. Ad. Arm. For., 355, 1962.
- 9) Deland, et al.: Rev. Tuberc., 26: 519, 1962.
- 10) 伊藤他: 日胸臨, 22: 36, 1963.
- 11) 山本他: 日胸臨, 22: 797, 1963.
- 12) 山本他: 胸部疾患, 8: 1070, 1964.
- 13) 岡他: 日胸臨, 23: 30, 1964.
- 14) 五味他: 日胸臨, 23: 77, 1964.
- 15) 金井他: 結核, 39: 69, 1964.
- 16) 河盛他: Chemotherapie, 11: 384, 1963.